昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, January 2013, 56(1): 9 –17　ISSN 0454-6296

中华蜜蜂感觉神经元膜蛋白基因克隆、组织表达分析及原核表达

胡颖颖，徐书法*，李　薇，Abebe Jenberie WUBIE，国占宝，周　婷*
（中国农业科学院蜜蜂研究所，农业部授粉昆虫生物学重点实验室，北京 100093）

摘要：为明确中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 嗅觉形成中重要功能因子的信号转导通路，本研究利用 RT-PCR 方法，克隆了中华蜜蜂感觉神经元膜蛋白（sensory neuron membrane protein，SNMP）基因编码区，GenBank 登录号为 KC012595，命名为 *AccSNMP*1。序列分析表明，该编码区开放阅读框长 1 563 bp，编码 520 个氨基酸，推测的编码蛋白的相对分子量和等电点分别为 58.02 kD 和 5.83。同源性比较发现，中华蜜蜂 *AccSNMP*1 与其他昆虫感觉神经元膜蛋白基因同源性差异很大，在氨基酸水平上与西方蜜蜂 *Apis mellifera* SNMP 基因一致性达 99.2%，与熊蜂 *Bombus impatiens* SNMP 基因一致性达 90.9%，而与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* SNMP 基因一致性仅为 22.7%。系统发育树显示中华蜜蜂与西方蜜蜂遗传距离最近。实时荧光定量 PCR 结果分析表明，*AccSNMP*1 在触角中表达量最高，在足中表达量较高，与胸、腹、头(去除触角和喙)、喙中表达量相比差异显著($P<0.05$)。构建原核表达载体 pEASY-E1-*AccSNMP*1，经 IPTG 诱导，中华蜜蜂感觉神经元膜蛋白在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21（DE3）中高效表达。结果为进一步研究 *AccSNMP*1 在中华蜜蜂体内的作用机理奠定了基础。

关键词：中华蜜蜂；感觉神经元膜蛋白；基因克隆；组织表达模式；原核表达
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2013)01-0009-09

Cloning, tissue expression profiling and prokaryotic expression of a sensory neuron membrane protein gene from *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

HU Ying-Ying, XU Shu-Fa*, LI Wei, Abebe Jenberie WUBIE, GUO Zhan-Bao, ZHOU Ting* (Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: To explore the signal transduction pathway of important factors in olfactory formation in *Apis cerana cerana*, the cDNA sequence encoding a sensory neuron membrane protein (SNMP) (GenBank accession no. KC012595), named as *AccSNMP*1, was cloned by RT-PCR from the Chinese honey bee, *Apis cerana cerana*. Sequence analysis results showed that the open reading frame (ORF) is 1 563 bp in length, encoding 520 amino acids with the predicted molecular weight of 58.02 kD and the theoretical isoelectric point of 5.83. Multiple sequence alignment indicated that *AccSNMP*1 from *A. cerana cerana* shares different identities with those from other nine insects at the amino acid level. The *AccSNMP*1 gene from *A. cerana cerana* has high amino acid sequence identity with that of *Apis mellifera* (99.2%) and *Bombus impatiens* (90.9%), while has the lowest amino acid sequence identity with that of *Tribolium castaneum* (22.7%). The phylogenetic analysis indicated that *A. cerana cerana* species has a close relationship with *A. mellifera* and *Bombus impatiens*. Tissue expression profiling of *AccSNMP*1 quantified by real time RT-PCR demonstrated that it was highly expressed in antennae and legs of *A. cerana cerana*, showing a significant difference with that in thorax, abdomen, proboscis and head without antennae and proboscis ($P<0.05$). A recombined plasmid pEASY-E1-*AccSNMP*1, containing the coding sequence of *AccSNMP*1, was constructed using pEASY-E1 as the fused expression vector, and AccSNMP1 was expressed successfully after induced with IPTG in BL21 (DE3) strain of *Escherichia coli*. The results

基金项目：国家自然科学基金项目(31072093)；农业部引进国外先进技术项目(2012-Z6)；国家蜂产业技术体系项目(nycytx-43-kxj 6)；中国农业科学院基本业务费项目(2008MF-1)
作者简介：胡颖颖，女，1986 年生，山东聊城人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂病理学，E-mail：huyingying_2008@163.com
*通讯作者 Corresponding authors, Tel.: 010-62592453; E-mail: phagraham@sina.com; ztapis@263.net
收稿日期 Received：2012-11-06；接受日期 Accepted：2012-12-21

provide the basis for further studying the functions of sensory neuron membrane protein gene in *A. cerana cerana* to better understand its action mechanisms.

Key words: *Apis cerana cerana*; sensory neuron membrane protein; gene cloning; tissue expression profile; prokaryotic expression

昆虫触角是感受化学信息的特化器官，到目前为止，在触角中至少发现有 5 种蛋白质与感受化学信息有关：即气味分子结合蛋白(odorant binding protein，OBP)和化学感受蛋白(chemosensory protein，CSP)，位于神经膜上的嗅觉受体蛋白(olfactory receptor，OR)，以及气味分子降解酶(odorant degrading enzyme，ODE)和感觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane protein，SNMP)等(Wang *et al.*，2003；Calvello *et al.*，2005；Forêt *et al.*，2007)。

自 20 世纪 90 年代以来，感觉神经元膜蛋白就一直是生物学领域研究的热点之一。感觉神经元膜蛋白基因在多音天蚕 *Antheraea polyphemus* 中最先被发现(Rogers *et al.*，1997)。随后一些昆虫的感觉神经元膜蛋白基因相继被克隆出来，如棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、家蚕 *Bombyx mori*、西方蜜蜂 *Apis mellifera*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 等昆虫(Rogers *et al.*，2001a，2001b；苏宏华等，2007；Jin *et al.*，2008；Vogt *et al.*，2009；孙乐娜，2010)。前人对昆虫 SNMP 的结构、功能及组织表达特性也进行了研究。目前一致的看法是，SNMP 是 CD36 基因家族中的重要一员，是一类参与细胞信号转导的受体基因(Nichols and Vogt，2008)。对 SNMP 结构预测表明，SNMP 是双跨膜蛋白，存在着翻译后修饰，多音天蚕的 *SNMP*1 先表达为 59 kD 的多肽，后被加工修饰为 69 kD 的多肽(Rogers *et al.*，1997)，在 C-端和 N-端各有一个跨膜域，并且还有几个 N-糖基化位点(Rogers *et al.*，1997，2001a)。Vogt 等(2009)根据家蚕 SNMP1 和其他鳞翅目 SNMP2 的序列鉴定出了家蚕的第 2 个感觉神经膜蛋白 SNMP2。苏宏华等(2007)研究了棉铃虫 SNMP 基因的组织表达特性，结果显示 SNMP 基因不仅在棉铃虫的触角中表达，也在去掉触角的头及足中表达。Peng 和 Qin(2011)对小菜蛾 *Plutella xylostella* 的 SNMP 基因组织表达特性进行了研究，荧光定量 PCR 结果表明，小菜蛾 SNMP 基因在触角、腹部、去除触角的头部、翅、足、胸中都有表达，但是在触角中的表达量要显著地高于其他部位。此外，在烟夜蛾 *Helicoverpa assulta* 中也有相关的研究报道(赵艳艳，2009)。

中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是蜜蜂科蜜蜂属中的一类重要的经济昆虫，也是我国珍贵的蜂种，近些年来由于环境变化、外来物种入侵等多种原因种群数量急骤下降，目前已经列入我国濒危物种名录。同西方蜜蜂等经济蜂种相比，中华蜜蜂具有抗逆性强、抗大蜂螨侵染和善于利用零星蜜源等优点(谭垦等，2002)，而这些优点集中体现在了其具有发达而灵敏嗅觉系统。

中华蜜蜂 SNMP 作为参与嗅觉形成与作用的重要功能因子，目前尚无研究报道。为明确 SNMP 在嗅觉形成中的生化功能，本文利用 RT-PCR 方法从中华蜜蜂触角克隆了感觉神经元膜蛋白基因，分析了该基因的系统进化，研究了该基因在中华蜜蜂不同组织中的表达特性，并实现了该基因的原核表达，旨在为进一步研究中华蜜蜂感觉神经元膜蛋白的生理功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 昆虫来源：中华蜜蜂 6–18 日龄后工蜂(内勤蜂)来自中国农业科学院蜜蜂研究所中蜂蜂群，根据实验需要取不同组织部位的材料。分别取多头工蜂的触角、头(去除触角和喙)、喙、胸、腹、足。将取下来的样品 100 mg 放入固定在冰上的 1.5 mL 的离心管中，样品全部取完后，立即放在液氮中冷冻，置 –70℃保存备用。

1.1.2 菌株与质粒：大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 DH5α、克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司。表达载体 pEASY-E1，大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1、BL21(DE3)菌株均购于全式金公司。

1.1.3 主要试剂：采用 Promega 公司的 RNA 反转录试剂盒(Promega 反转录试剂盒 A5000)，LA Taq DNA 聚合酶及荧光定量 PCR 试剂盒 One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司，PCR 产物及质粒回收试剂盒购自于中科瑞泰生物科技有限公司。

1.2 引物设计与合成

在 NCBI 中找出西方蜜蜂的感觉神经元膜蛋白

基因（XM_397430.3）的序列，设计第一对特异性引物用于扩增中华蜜蜂 SNMP 基因的全长阅读框，SNMP-Forward：5′-ATGAAGCCGAAAAAATTAGGAAT-3′，SNMP-Reverse：5′-TTAATCCGCGTCGAGATTAGG-3′。根据荧光定量引物设计原则，设计第 2 对引物用于荧光定量 PCR，Sense SNMP：5′-GGGGATTCTCAATAAGGC-3′，Anti-sense SNMP：5′-CTGGTCCATCGGCTATCA-3′。第 3 对引物用于内参基因 *β-actin* 的扩增，引物为：*β-actin*-Forward：5′-GCAAAAAGAAATCACTGCCCTA-3′，*β-actin*-Reverse：5′-GGATGGTCCAGACTCGTCGTAT-3′。上述引物在北京博迈德科技发展有限公司合成。

1.3　中华蜜蜂各组织总 RNA 的提取

根据 Wang 等（2003）方法用 Trizol 试剂（Invitrogen 公司产品）提取中华蜜蜂不同组织总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop ND-2000 定量总 RNA 的纯度和浓度。

1.4　第一链 cDNA 的合成

将不同组织的总 RNA 稀释到 1 μg/μL，分别取 1 μL 进行反转录合成第一链 cDNA。得到的第一链 cDNA 在 -20℃保存备用。

1.5　基因的 RT-PCR 扩增

以触角 cDNA 为模板，使用第一对引物，加入 TaKaRa LA Taq DNA 聚合酶（5 U/μL）0.25 μL，正反向引物各 1 μL，10 × LA PCR Buffer Ⅱ（Mg^{2+} plus）2.5 μL，dNTPs Mixture 4 μL，1 μL cDNA，加水至 25 μL。反应条件为：94℃ 5 min，94℃ 30 s，55℃~45℃，梯度降温 1℃，30 s，72℃ 90 s，10 个循环，94℃ 30 s，45℃ 30 s，72℃ 90 s，30 个循环，72℃ 延伸 7 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6　PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物回收纯化后，连接到 pMD19-T 载体上（按 Kit 说明书操作），然后转化大肠杆菌 Trans1-T1，挑取白色菌落，放入含有氨苄 50 μg/mL 的 LB 液体培养基中，振荡培养过夜。做菌液 PCR 验证，挑取阳性克隆，送至华大基因测序。

1.7　序列分析

应用 BioEdit 软件将所得到的 DNA 序列翻译成蛋白质序列，从 GenBank 数据库检索并下载昆虫感觉神经元膜蛋白基因序列，比较中华蜜蜂与其他昆虫感觉神经元膜蛋白基因的氨基酸序列一致性。应用 Tmap 软件预测中华蜜蜂 SNMP 跨膜结构域（Persson and Argos，1996）。应用 Clustal X 和 MEGA 4 进行序列对比并建立系统发育树。

1.8　荧光定量 PCR 及基因组织表达特性分析

制备中华蜜蜂的触角、头部（去除触角和喙）、喙、胸部、腹部、足 6 个组织的 RNA，经 DNase Ⅰ 处理、RNA 定量后，进行反转录。以触角的 cDNA 为模板，使用第 2 对和第 3 对引物，设置 5 个浓度梯度：1，0.1，0.01，0.001 和 0.0001 ng/μL，制作标准曲线，分析 E 值、R^2 和斜率，判定所建立的实时荧光定量 PCR 方法的可靠性；确定其最适浓度。各组织部位的荧光定量 PCR：以 2 μL cDNA 为模板，加入 SYBR Premix Ex Taq™（2 ×）10 μL，正向和反向引物（分别为 Sense SNMP 和 Anti-sense SNMP）各 0.8 μL（10 μmol/L），内标基因 *β-actin* 的上下游扩增引物各 0.8 μL，ROX Reference Dye Ⅱ（50 ×）0.4 μL，加 ddH_2O 至 20 μL。反应条件为：95℃ 30 s 预变性，95℃ 5 s，60℃ 30 s，40 个循环，每个循环后采集荧光生成扩增曲线和溶解曲线。根据各组织检测到的 C_T 值分析该基因的组织表达特性。

1.9　原核表达载体的构建及 PCR 鉴定

将得到的 PCR 全长产物采用纯化试剂盒纯化回收。加 4 μL PCR 产物，1 μL pEASY-E1 载体，轻轻混合，室温反应 15 min。将构建好的载体转化到 Trans1-T1 感受态细胞。菌落 PCR 方法鉴定正确表达方向的阳性重组子，使用引物为 T7 启动子引物和目的基因反向引物。PCR 反应条件，94℃ 10 min，94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 90 s，30 个循环，72℃ 10 min。阳性重组子送华大基因公司测序验证。

1.10　中华蜜蜂 SNMP 基因的原核表达

挑选测序正确的含有目的片段的阳性克隆。测序正确后，再将质粒转化到 BL21（DE3）中，挑取单克隆，接种于 LB/Amp^+ 培养基中，200 r/min 剧烈振荡培养，至 OD_{600} 达到 0.5 时，加入 IPTG 诱导表达，表达结束后收集菌体，提取可溶性蛋白后，用 12.5% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白，并用考马斯亮蓝染色检测蛋白的表达情况。

1.11　原核表达重组蛋白的鉴定

切取 SDS-PAGE 凝胶上的对应条带约 100 mg，利用 ABI Mass Spectrometry 4700 对重组蛋白进行质谱鉴定（北京华大基因公司），方法参考仪器操作规程。

1.12　数据统计与分析

根据各样品对应的 *β-actin* 所得的 C_T 值，作为

阳性对照利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法(Livak and Schmittgen, 2001)对各样品进行较正，分析中华蜜蜂 SNMP 基因在各部位的表达情况。不同样本之间的差异显著性分析采用 ANOVA 方法进行($P \leqslant 0.05$, LSD 多重比较)。

2 结果

2.1 中华蜜蜂 SNMP 基因的克隆

以中华蜜蜂触角 cDNA 为模板，SNMP-Forward 和 SNMP-Reverse 为引物进行扩增，电泳回收得到 1 500 ~ 1 700 bp 的片段(图 1)，与 pMD19-T 载体连接，转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞，根据蓝白斑筛选阳性重组子，菌液 PCR 进行鉴定，确定重组子中含有目的片段，然后进行测序，获得有效序列 1 648 bp。将测序结果在 NCBI 上进行同源搜索，结果表明所测序列与多种昆虫的 SNMP 基因序列高度同源。该序列命名为 *AccSNMP*1，并提交 GenBank 后获得登录号为 KC012595。

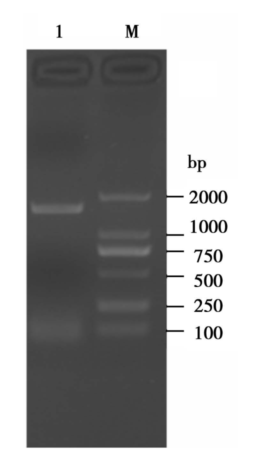


图 1 中华蜜蜂 SNMP 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of SNMP gene from *Apis cerana cerana*

M: DNA 标准 DNA marker DL2000; 1: 触角 cDNA 作为模板 cDNA from antennae as the template.

2.2 中华蜜蜂 *AccSNMP*1 的编码区及跨膜区分析

对测序结果进行了编码区及跨膜区分析。结果显示该序列开放阅读框长 1 563 bp，共编码 520 个氨基酸残基(图 2)，推测编码蛋白的分子量为 58.02 kD，等电点为 5.83。

本文用 TMAP 软件预测了中华蜜蜂 AccSNMP1 的跨膜结构。结果表明该蛋白属于双跨膜蛋白，第 8 ~ 36 位氨基酸是第 1 个跨膜区(TM1)，第 445 ~ 473 位氨基酸是第 2 个跨膜区(TM2)。这与前人的研究结果一致(Rogers *et al*., 1997, 2001a)。

2.3 中华蜜蜂 *AccSNMP*1 与其他昆虫 SNMP 基因的同源性分析及系统发育树

中华蜜蜂 *AccSNMP*1 与已报道的其他昆虫 SNMP 基因的氨基酸序列同源性分析结果表明，中华蜜蜂 *AccSNMP*1 与不同种类昆虫 SNMP 基因一致性差别较大(图 3)。其中，中华蜜蜂 *AccSNMP*1 与西方蜜蜂 *Apis mellifera* SNMP 基因(GenBank 登录号: XP_397430)的一致性较高，达 99.2%；其次是与熊蜂 *Bombus impatiens* SNMP 基因(GenBank 登录号: XP_003488337)，一致性为 90.9%。而与家蚕 *Bombyx mori* SNMP 基因(GenBank 登录号: NP_001037186)的一致性为 59.3%，与多音天蚕 *Antheraea polyphemus* SNMP 基因(GenBank 登录号: AAC47540)的一致性为 60.2%，与甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* SNMP 基因(GenBank 登录号: AAO15603.1)的一致性为 60.1%，与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* SNMP 基因(GenBank 登录号: NP_650953.1)的一致性为 55.1%，与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* SNMP 基因(GenBank 登录号: AAO15604.1)的一致性 60%，与埃及伊蚊 *Aedes aegypti* SNMP 基因(GenBank 登录号: ABX10906.1)的一致性为 52.2%。与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* SNMP 基因(GenBank 登录号: EFA02900.1)的一致性最低，仅为 22.7%。

利用 MEGA 4 对上述 10 种昆虫的 SNMP 基因进行了系统进化分析(图 4)。结果表明，在选定的 10 种昆虫中，中华蜜蜂 *AccSNMP*1 与同为膜翅目的西方蜜蜂、熊蜂的 SNMP 基因进化关系最近，而与双翅目、鳞翅目等其他种类的昆虫关系较远。

2.4 中华蜜蜂 *AccSNMP*1 的组织表达特性

为了明确 *AccSNMP*1 在中华蜜蜂体内的组织表达，我们采用荧光定量 PCR 对中华蜜蜂不同组织 *AccSNMP*1 的表达量进行了分析。经过对目的基因和内参基因的 C_T 值进行计算，用得到的 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 值进行方差分析。

结果显示，*AccSNMP*1 在触角和足中的表达量显著高于其他 4 个部位($P < 0.05$)，触角和足中基因的表达也有显著差异($P < 0.05$)，头(去除触角和喙)、喙、胸、腹中 *AccSNMP*1 的表达量没有显著差异($P > 0.05$)。各个组织中的表达量由高到低为：触角(1.0000 ± 0.00000) > 足(0.8273 ± 0.11490) > 胸(0.0967 ± 0.01779) > 喙(0.0963 ± 0.03782) > 头(去除触角和喙)(0.0750 ± 0.03032) > 腹(0.0160 ± 0.00235)(图 5)。

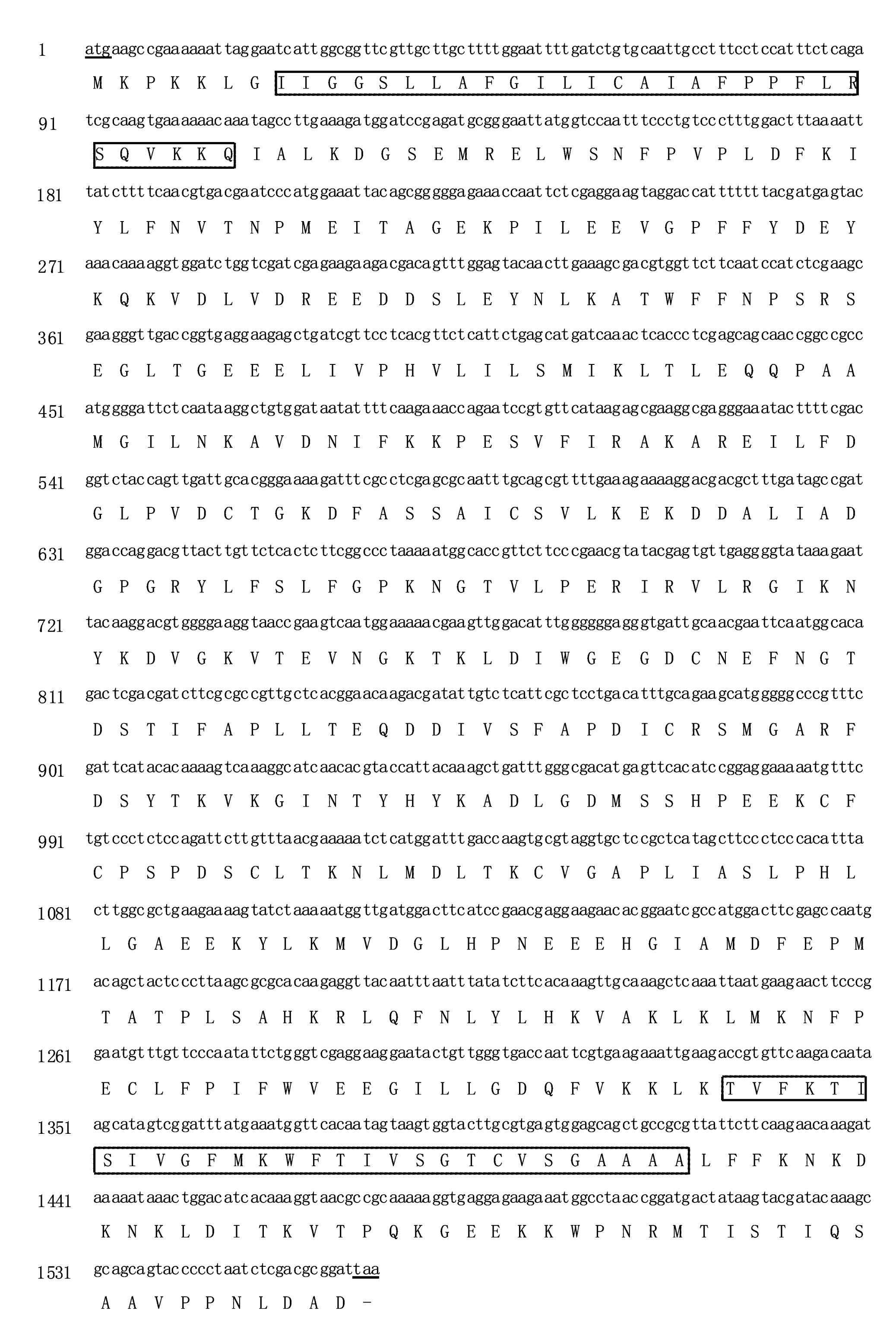


图 2　中华蜜蜂 *AccSNMP1* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2　Neucleotide and deduced amino acid sequences of *AccSNMP1* from *Apis cerana cerana*

方框所示为跨膜区，下划线所示为起始密码子和终止密码子。Transmembrane regions are boxed, while the initiation codon and terminate codon are underlined.

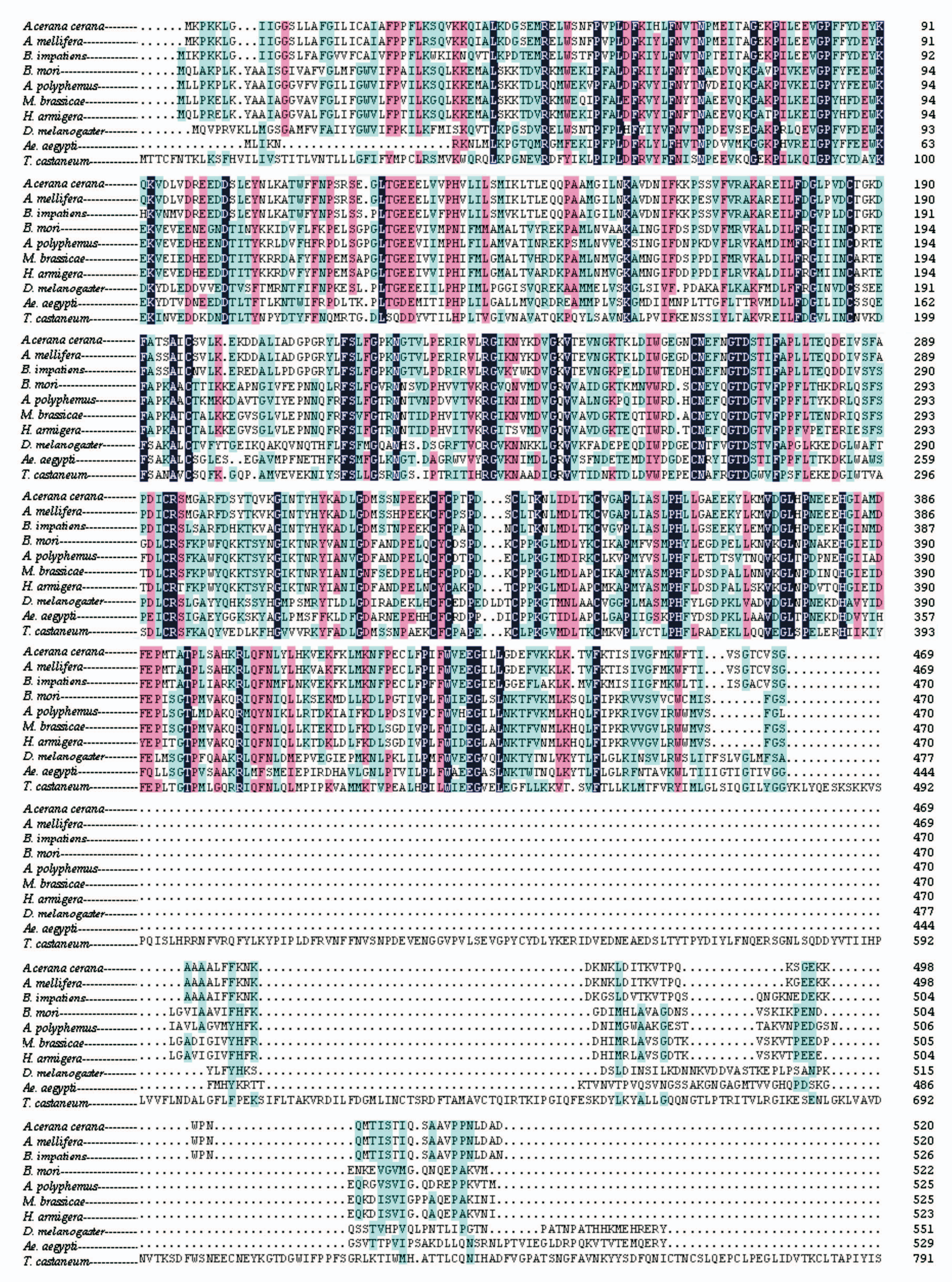


图 3 中华蜜蜂与其他昆虫 SNMP 氨基酸序列的同源性比较

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of SNMPs from *Apis cerana cerana* and other insects

图中黑色代表一致性为 100%，红色表示一致性为 75% 以上，绿色表示一致性为 50% 以上 The black shade in the figure indicates 100% sequence identity, the red indicates over 75% sequence identity and the green indicates over 50% sequence identity. SNMP 的来源及 GenBank 登录号为 The origin of SNMPs and their GenBank accession numbers are：西方蜜蜂 *Apis mellifera*（XP_397430）；熊蜂 *Bombus impatiens*（XP_003488337）；家蚕 *Bombyx mori*（NP_001037186）；多音天蚕 *Antheraea polyphemus*（AAC47540）；甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*（AAO15603.1）；棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（AAO15604.1）；黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*（NP_650953.1）；埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（ABX10906.1）；赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（EFA02900.1）.

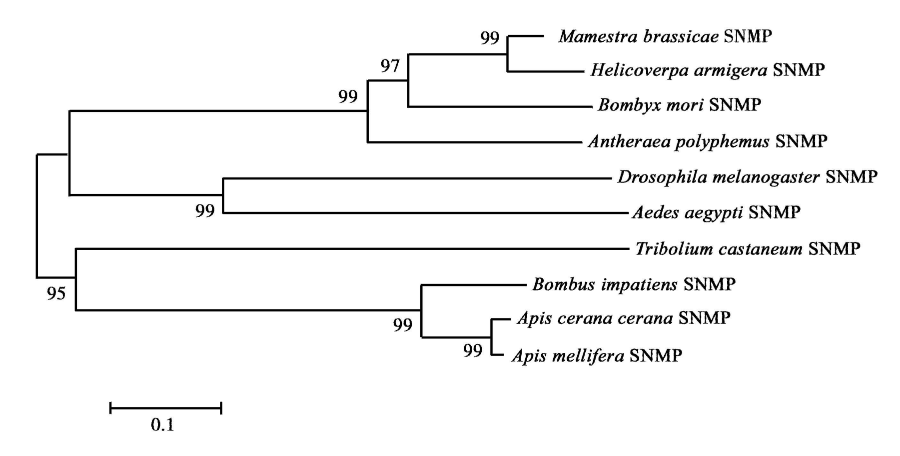


图 4　几种昆虫的 SNMP 进化分析

Fig. 4　Phylogenetic analysis of SNMPs in some insects

各昆虫 SNMP 的 GenBank 登录号同图 3。The GenBank accession numbers of SNMPs from various insects are the same as in Fig. 3.

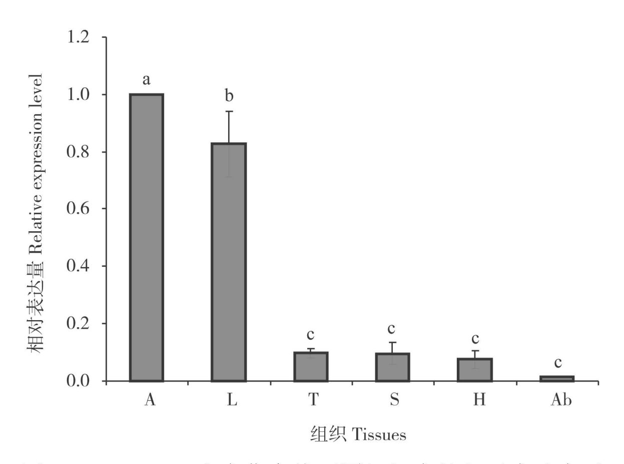


图 5　*AccSNMP*1 在中华蜜蜂不同组织中的相对表达水平

Fig. 5　Expression level of *AccSNMP*1 in different tissues of *Apis cerana cerana*

A：触角 Antennae；H：头 Head；P：喙 Proboscis；T：胸 Thorax；Ab：腹 Abdomen；L：足 Legs. 图中数值为平均值 ± *SD*，柱上不同字母表示不同组织间基因表达存在显著差异（$P < 0.05$）（LSD 多重比较）。Data in the figure are means ± *SD*, and those with different letters above bars are significantly different at the 0.05 level (LSD multiple comparison).

2.5　中华蜜蜂 *AccSNMP*1 原核表达及重组蛋白的鉴定

将所克隆的 *AccSNMP*1 重组入 pEASY-E1，构建重组表达载体 pEASY-E1-*AccSNMP*1，将重组质粒转化入 BL21（DE3）中。经 IPTG 诱导 3 ~6 h 能表达出 AccSNMP1 蛋白。12.5% SDS-PAGE 电泳显示（图 6），IPTG 诱导的转入重组表达载体（pEASY-E1-*AccSNMP*1）的大肠杆菌在 63 kD 处出现了特异的融合蛋白（箭头所示），而未诱导的重组表达载体没有产生该特异条带。从图上看，随着诱导时间的延长，其表达量大致相同。结果证明，AccSNMP1 蛋白在大肠杆菌内成功表达。

对重组蛋白的质谱鉴定结果表明，该重组蛋白与登录号 Gi110760062 的蛋白（西方蜜蜂 *A. mellifera* SNMP）相匹配。可以确定该蛋白为中华蜜蜂的感觉神经元膜蛋白。

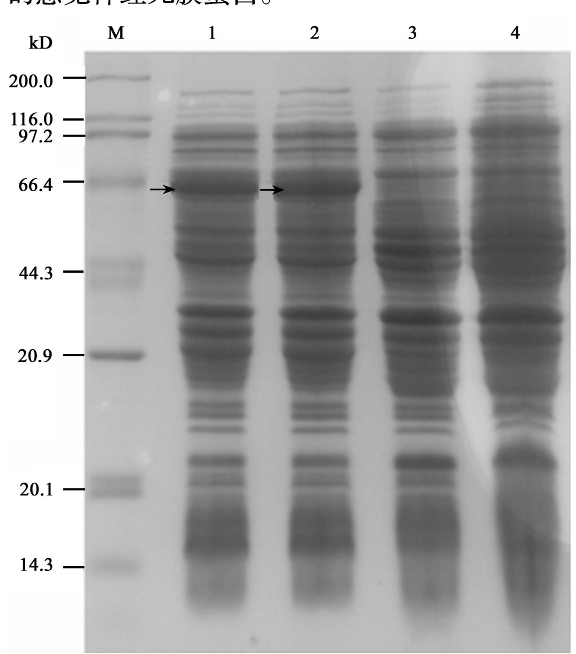


图 6　中华蜜蜂 AccSNMP1 原核表达

Fig. 6　Prokaryotic expression of AccSNMP1 from *Apis cerana cerana*

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1，2：IPTG 诱导的 pEASY-E1-AccSNMP1 菌体蛋白 pEASY-E1-AccSNMP1 fusion protein induced by IPTG；3：pEASY-E1-AccSNMP1 未诱导的菌体蛋白 pEASY-E1-AccSNMP1 fusion protein without induction；4：空感受态细胞菌体蛋白 BL21（DE3）protein. 箭头示目的蛋白。The arrows show the pEASY-E1-AccSNMP1 fusion protein.

3 讨论

3.1 昆虫 SNMP 的发现及其功能假说

Buck 和 Axel(1991)发现了脊椎动物 *Rattus norvegicus* 的嗅觉受体基因家族，随之 Troemel 等(1995)发现了秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 的嗅觉受体。与此同时，人们采用同源克隆的方法，试图克隆出昆虫的嗅觉受体基因，但均以失败告终(Robertson *et al.*, 2003; Jacquin and Merlin, 2004)。第一个从昆虫中获得的嗅觉蛋白受体是 Krieger 等(2003)利用 PCR 方法从膜翅目的西方蜜蜂 *A. mellifera* 及双翅目的绿头蝇 *Calliphora erythrocephala* 克隆到的嗅觉受体蛋白的亚结构区。而在昆虫诸多的嗅觉受体中，感觉神经元膜蛋白受体一直都是研究的中心和热点(Jacquin and Merlin, 2004)。其中对 SNMP 蛋白参与的信号过程进行研究成为焦点，并为此提出了许多假说。第一个也是至今为止得到认可的 SNMP 蛋白功能的假说是 Vogt 等(1988)提出的，他们认为，感觉神经元膜蛋白是嗅觉受体中的一员，这个假说是从鳞翅目昆虫信息素的光亲和类似物能够特异结合信息素膜蛋白受体推导而来，因为这个受体膜蛋白在大小及组织分布上与 SNMP 极其相似，膜蛋白可以直接与信息素结合，也可以与信息素-信息素结合蛋白复合体结合。可惜的是，这个假说没有得到进一步的实验验证。

3.2 昆虫 SNMP 的进化地位

本研究克隆的中华蜜蜂 *AccSNMP*1 与已知同为膜翅目的西方蜜蜂及熊蜂属熊蜂的 SNMP 基因序列一致性最高，达 90% 以上，在进化地位上也最近；而与鳞翅目和双翅目的昆虫 SNMP 的氨基酸序列则有多个氨基酸的不同，在氨基酸水平上具有 50% ~ 65%左右的一致性，与鞘翅目的赤拟谷盗序列 SNMP 的一致性仅达 22.7%，在进化关系上亦较远。由此说明，该基因除了具有相对保守性外，也存在着一定的变异，该蛋白在不同物种间的功能也会有所差异。

3.3 昆虫 SNMP 基因的组织表达特性

前人研究表明神经元、受体和 OBP 都位于毛状感器内，并认为 SNMP 作为感觉神经元膜蛋白，主要参与嗅觉的形成(Rogers *et al.*, 1997)。本实验对中华蜜蜂 *AccSNMP*1 在不同组织中的表达特性进行了分析，实时荧光定量 PCR 结果表明，*AccSNMP*1 在中华蜜蜂成蜂的大部分组织中表达，其中在触角及足中表达量最高，显著地高于头(除去触角和喙)、喙、胸及腹部中。同时，我们对西方蜜蜂该基因的组织表达特性的研究结果也显示了同样的表达规律(未发表资料)，这与前人得出的在棉铃虫中该基因的表达规律是一致的。苏宏华等(2007)认为 SNMP 基因在棉铃虫雌雄触角中都有表达，且没有明显差异，在去除触角的头、喙、下颚须、下唇须、足、刚羽化的成虫、10 日龄蛹以及卵中也有表达。本实验研究结果与前人的其他研究结果有所不同。前人同时认为 SNMP 基因的表达具有触角特异性。Rogers 等(1997)首次在多音天蚕中发现 SNMP，并分析了其时空表达特性，通过 Northern blotting 和 RNA 酶保护试验，发现 SNMP 在多音天蚕的雌雄虫触角中有所表达，而头、胸、足中没有表达；Leal 等(2009)对脐橙螟 *Amyelois transitella* 和 Benton 等(2007)对果蝇 SNMP 的研究结果也表明，SNMP 的表达同样具有触角特异性。由此说明，SNMP 的表达与昆虫的种类密切相关，在不同种类的昆虫中 SNMP 的表达具有较强的时空性。与前面讨论中提及的不同物种间序列的差异较大的研究结果共同说明，该基因在不同物种的昆虫中可能存在着一定的功能差异，在某些昆虫中仅具有嗅觉感觉相关的受体功能，而在另一些昆虫中除具有相应的嗅觉感受功能外，还具有其他化学感觉的受体功能(Nichols and Vogt, 2008; Vogt *et al.*, 2009)。本实验从中华蜜蜂足中发现了 *AccSNMP*1 的高水平表达，由此可以解释中华蜜蜂在具有较强的嗅觉感受的同时，也能够通过其他化学感觉灵敏地感受外界环境。

3.4 感觉 SNMP 与中华蜜蜂抗螨的关系

蜂螨是一类对蜜蜂危害最大的寄生虫。与经济蜂种西方蜜蜂相比，中华蜜蜂表现出较强的抗螨性。现有的研究表明，中华蜜蜂嗅觉发达，能够灵敏地感受到蜂螨的侵染是其抗螨的重要机制。目前尚未见蜜蜂感觉神经元膜蛋白分子特征的研究报道，也未见 AccSNMP1 在中蜂抗螨中的分子功能及其细胞信号转导通路研究报道，这都有待于我们去进一步探索。

参考文献(References)

Benton R, Vannice KS, Vosshall LB, 2007. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature*, 450(7167): 289 - 293.

Buck L, Axel R, 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1):

175 – 187.

Calvello M, Brandazza A, Navarrini A, Dani F, Turillazzi S, Felicioli A, Pelosi P, 2005. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4): 297 – 307.

Forêt S, Wanner KW, Maleszka R, 2007. Chemosensory proteins in the honey bee: insights from the annotated genome, comparative analyses and expressional profiling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1): 19 – 28.

Jacquin JE, Merlin C, 2004. Insect olfactory receptors: contributions of molecular biology to chemical eclology. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 2359 – 2395.

Jin X, Ha TS, Smith DP, 2008. SNMP is a signaling component required for pheromone sensitivity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(31): 10996 – 11001.

Krieger J, Klink O, Mohl C, Raming K, Breer H, 2003. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 189(7): 519 – 526.

Leal WS, Ishida Y, Pelletier J, Xu W, Rayo J, Xu X, Ames JB, 2009. Olfactory proteins mediating chemical communication in the navel orangeworm moth, *Amyelois transitella*. *PLoS ONE*, 4(9): e7235.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.

Nichols Z, Vogt RG, 2008. The SNMPCD36 gene family in Diptera, Hymenoptera and Coleoptera: *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, and *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(4): 398 – 415.

Peng YL, Qin YC, 2011. Molecular cloning and characterization of sensory neuron membrane protein and expression pattern analysis in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Applied Entomology and Zoology*, 46(4): 497 – 504.

Persson B, Argos P, 1996. Topology prediction of membrane proteins. *Protein Science*, 5(2): 363 – 371.

Robertson HM, Warr CG, Carlson JR, 2003. Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(Suppl. 2): 14537 – 14542.

Rogers ME, Krieger J, Vogt RG, 2001a. Antennal SNMPs (sensory neuron membrane proteins) of Lepidoptera define a unique family of invertebrate CD36-like proteins. *Journal of Neurobiology*, 49(1): 47 – 61.

Rogers ME, Steinbrecht RA, Vogt RG, 2001b. Expression of SNMP-1 in olfactory neurons and sensilla of male and female antennae of the silkmoth *Antheraea polyphemus*. *Cell and Tissue Research*, 303(3): 433 – 446.

Rogers ME, Sun M, Lerner MR, Vogt RG, 1997. Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth *Antheraea polyphemus* with homology to the CD36 family of membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23): 14792 – 14799.

Su HH, Wang GR, Zhang YJ, Liang GM, Wu KM, Guo YY, 2007. Cloning and expression of sensory neuron membrane protein in *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*, 50(1): 7 – 13. [苏宏华, 王桂荣, 张永军, 梁革梅, 吴孔明, 郭予元, 2007. 棉铃虫感觉神经元膜蛋白基因克隆和表达. 昆虫学报, 50(1): 7 – 13]

Sun LN, 2010. The Genomic Identification and Functional Study of a Sensory Neuron Membrane Protein (SNMP) Gene Family in the Silkworm, *Bombyx mori*. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [孙乐娜, 2010. 家蚕感受神经膜蛋白（SNMP）基因家族的基因组鉴定与功能分析. 重庆: 西南大学硕士学位论文]

Tan K, Yu YS, Zhang XW, 2002. Resistance of mites *Varroa jacobsoni* of *Apis cerana* colonies. *Apiculture of China*, 53(6): 10 – 12. [谭垦, 余玉生, 张学文, 2002. 东方蜜蜂抗螨的试验研究. 中国养蜂, 53(6): 10 – 12]

Troemel ER, Chou JH, Dwyer ND, Colbert HA, Bargmann CI, 1995. Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell*, 83(2): 207 – 218.

Vogt RG, Miller NE, Litvack R, Fandino RA, Sparks J, Staples J, Friedman R, Dickens JC, 2009. The insect SNMP gene family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(7): 448 – 456.

Vogt RG, Prestwich GD, Riddiford LM, 1988. Sex pheromone receptor proteins. Visualization using a radiolabeled photoaffinity analog. *Journal of Biological Chemistry*, 263(8): 3952 – 3959.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2003. Cloning, expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein gene from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(1): 115 – 124.

Zhao YY, 2009. Gene Cloning, Sequencing and Tissue-specific Expression of Sensory Neuron Membrane Protein from *Helicoverpa assulta*. MSc Thesis, Henan Agricultural University, Zhengzhou. [赵艳艳, 2009. 烟夜蛾感觉神经元膜蛋白基因的克隆、序列分析、原核及组织特异性表达. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文]

（责任编辑：赵利辉）